Lane Medical Library

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München.

Vorstand: Professor Dr. Ph. Broemser.

Untersuchungen über ein Dehydrasesystem der Hefe.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München.

Vorgelegt von

Rudolf Dünnwald
appr. Zahnarzt
aus München.

München
Buchdruckerei Hohenhaus, Landwehrstraße 29 (Ecke Schillerstraße)
1935

Referent: Professor Dr. Amandus Hahn.

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dez. 1934.

Meinen lieben Eltern gewidmet!

Inhaltsverzeichnis.

A. Theoretischer Teil.
I. Biologische Oxydationstheorien.
a) Warburg
b) Wieland
c) Szent-György.
II. Problemstellung.
B. Experimenteller Teil.
I. Versuche mit Hefeextrakt
a) Entfärbungsversuche mit Methylenblau
b) Acetonbestimmungsversuche
II. Versuche mit Lebedewsaft
a) Entfärbungsversuche mit Methylenblau
b) Acetonbestimmungsversuche.
III. Versuche mit Müllerlösung
a) Entfärbungsversuche mit Methylenblau
b) Acetonbestimmungsversuche
1. Verhalten mit Methylenblau
2. » » Sauerstoff
3. » » Toluol
4. » » Phenylurethan
5. » » Natriumfluorid
6. » » Ammoniumoxalat
7. » » Essigester
8. » » Laktat
C. Ergebnisse.
D. Zusammenfassung.
E. Literaturangaben.

A. Theoretischer Teil.

Nachfolgende Untersuchungen beschäftigen sich mit einem Fermentsystem der Hefe. Im vorliegenden Falle handelt es sich um eine Dehydrase, also um eines der spezifischen Fermente, die bei den Atmungsvorgängen der Zelle eine große Rolle spielen.

Unter der Atmung der Zelle versteht man im chemisch-biologischen Sinne einen Oxydationsvorgang. Eine Oxydation findet dann statt, wenn ein Stoff durch Aufnahme von Sauerstoff bezw. Wegnahme von Wasserstoff in einen anderen übergeführt wird. Jede einfache Verbrennung ist eine Oxydation. Atmungserscheinungen der Zelle sind Verbrennungen, bei denen Stoffe, die in der Zelle gespeichert worden sind, mit Hilfe des atmosphärischen Sauerstoffs abgebaut werden unter Lieferung von Energie. Die Erscheinung, daß der oxydative Abbau, der in der Zelle aufgebauten Stoffwechselprodukte außerhalb der Zelle unter gleichen Bedingungen, also im sog. Reagensglasversuch meist nur teilweise, ja überhaupt nicht zustande kam, ließ den Schluß zu, daß Fermente die Atmung bewirken, die sogen. Oxydasen, die den Sauerstoff übertragen sollen.

Die heutigen Theorien basieren nicht mehr ganz auf dieser Anschauung. Auf den heutigen Hypothesen beruhen aber alle neuesten Untersuchungen über den oxydativen Abbau der Zellsubstrate, und da meine Arbeit auf den Prinzipien der Wieland'schen Dehydrierungstheorie fußt, ist es nötig, für das Verständnis meiner Versuche kurz auf den Inhalt der jetzigen Atmungstheorien einzugehen:

1. die Wieland'sche Dehydrierungstheorie
2. die Warburg'sche Sauerstoffaktivierungstheorie
3. die Szent-Györgyi'sche kombinierte Wasserstoff- und Sauerstoffaktivierungstheorie.

I. Biologische Oxydation.

1. Warburg'sche Theorie (29).

Nach dieser sind zwei Mittel notwendig, um eine biologische Oxydation hervorzurufen. Einmal die Aktivierung des molekularen Sauerstoffs durch Eisenverbindungen und dann die Adsorption. Die Atmung ist nach Warburg ein kapillarchemischer Vorgang, der an den Oberflächen der Eisenverbindungen enthaltenden festen Zellbestandteile stattfindet. Diese Eisenverbindungen verursachen eine Aktivierung des molekularen Sauerstoffs in folgender Weise: Der Sauerstoff wird von den niederen Oxydationsstufen der Eisenverbindungen gebunden, indem er diese zu höheren Oxydationsstufen oxydiert. Nur in dieser Form kann nach Warburg das Eisen mit der abbaufähigen Zellsubstanz reagieren unter Reduktion der höheren Oxydationsstufe zu der ursprünglich niederen Eisenverbindung. Das Eisen erscheint also am Ende der Reaktion genau in der gleichen Form, in der es in den Atmungsvorgang eingegriffen hat, es wirkt wie ein Katalysator.

Nach Warburg ist demnach die Zellatmung eine Eisenkatalyse. Es ist ein Stoff notwendig, der den molekularen Sauerstoff aktiviert und W. bezeichnet ihn als Atmungsferment, wobei er darunter die Summe aller katalytisch wirkenden Eisenverbindungen, die in der Zelle vorkommen, versteht. (30, 13).

Die Adsorption spielt eine Rolle insofern, als durch sie die trägen organischen Verbindungen an den eisenhaltigen Oberflächen der festen Zellbestandteile dem Sauerstoff gegenüber reaktionsfähig gemacht werden.

Warburg (13) sagt: Ob wir nun den Begriff der Atmung eng oder weit fassen, immer wird das Eisen als der sauerstoff-

übertragende Bestandteil seine zentrale Stellung behalten, denn die Oxydation ist derjenige Vorgang, durch den sich die Atmung von den anderen Fermentreaktionen unterscheidet und in der sich der Sinn der Atmung, nämlich die Gewinnung der Energie, erfüllt.

Sowohl alle älteren Theorien, als auch die oben dargelegte Warburg'sche verlangen eine Umwandlung des molekularen Sauerstoffs in eine aktive Form durch gewisse Stoffe. Im Gegensatz hierzu steht Wieland mit seiner 1913 aufgestellten Dehydrierungstheorie.

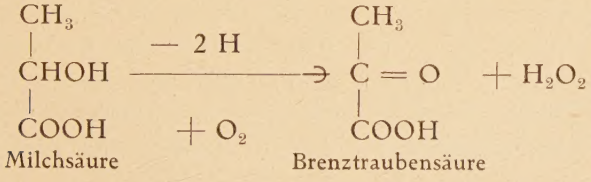
2. Wieland'sche Dehydrierungstheorie (32).

Wieland nimmt an, daß bei biologischen Oxydationen nicht der Sauerstoff im Molekül der zu oxydierenden Substanz der Zelle angreift, daß nicht Zellfermente eine Aktivierung des Sauerstoffs bewirken, sondern daß dem Sauerstoff eine passive Rolle zufällt. Durch gewisse Fermente der Zelle werden Wasserstoffatome der oxydablen Substanz aktiviert, die dadurch mobilisiert, nun mit dem molekularen Sauerstoff reagieren, d. h. in eine Verbindung eingehen. Der Sauerstoff übernimmt dann die Rolle eines Akzeptors der Wasserstoffatome, die Fermente werden Dehydrasen genannt, der ganze Vorgang heißt eine Dehydrierung.

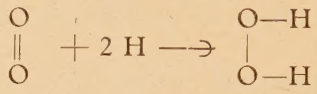
Sie verläuft nach dem Schema:

$$AH_2 \text{ (Wasserstoffdonator od. oxydable Subst.)} + O_2 \text{ (Wasserstoffakzeptor)} \rightarrow A + H_2O_2.$$

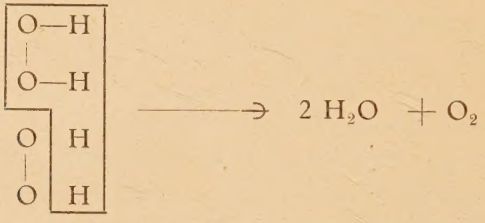
Ein einfaches Beispiel hierfür ist die Oxydierung (= Dehydrierung) der Milchsäure zu Brenztraubensäure bei Gegenwart der spezifischen Milchsäuredehydrate nach folgender Formel:



Nebenher geht die Entstehung von Wasserstoffsuperoxyd als Oxydationsprodukt des aktivierten Wasserstoffs mit dem als Akzeptor dienenden Sauerstoff.



Dieses entstehende Peroxyd, sowie die bei anderen Dehydrierungsprozessen entstehenden Peroxyde sind aber für die Zelle giftig. Sie müssen zerstört werden und zwar geschieht dies durch Fermente, die sogen. Katalasen, die zwei Moleküle Wasserstoffsuperoxyd zerlegen in Wasser und Sauerstoff, wobei die Katalasen als Dehydrasen wirken, indem sie den Wasserstoff aktivieren.



Der frei werdende Sauerstoff kann jetzt seine Rolle als Wasserstoffakzeptor wieder übernehmen.

Nach dieser Theorie müßte es möglich sein, biologische Oxydationen vorzunehmen auch ohne Gegenwart von Sauerstoff. Man müßte also, da der Sauerstoff ja nur die Rolle eines Wasserstoffakzeptors hat, Stoffe finden, die die Fähigkeit besitzen, mobilisierte Wasserstoffatome aufzunehmen. Man nennt diese Substanzen künstliche Wasserstoffakzeptoren im Gegensatz zu Sauerstoff, der einen natürlichen Wasserstoffakzeptor darstellt. Künstliche Akzeptoren sind vor allem Methylenblau und Chinon. Solche biologischen Oxydationen sind gelungen. Man konnte also Dehydrierungen vornehmen ohne Gegenwart von Sauerstoff und darin liegt eine der stärksten Stützen der Wieland'schen Theorie. Wieland belegte seine Theorie mit

Beispielen rein chemischer Natur sowie auch mit biologischen Oxydationen.

Thunberg (27) und Ahlgreen (2) untersuchten die Dehydrierungen von Fettsäuren Oxyfettsäuren, Aminosäuren und anderen Säuren bei Gegenwart von Methylenblau als künstlichem Wasserstoffakzeptor im Vakuum.

Hahn, Fischbach und Haarmann (5, 6) gelang es, Milchsäure durch eine Dehydrase des Muskelbreies zu Brenztraubensäure zu dehydrieren, ferner wiesen sie nach, daß der Abbau von Glyzerin-Phosphorsäure, Hexosediphosphorsäure im Muskelbrei bei Gegenwart von Methylenblau auch Dehydrierungen vorstellen (7).

Hahn, Fischbach und Niemer stellten das Vorhandensein spezifisch wirkender dehydrierender Fermente in einem, nach bestimmter Methode gewonnenen Hefeextrakt fest und fanden auch hier wieder eine Dehydrierung der Milchsäure zu Brenztraubensäure bei Gegenwart von Methylenblau als Akzeptor. Es ergab sich die Tatsache, daß mit Methylenblau als Akzeptor eine wesentlich stärkere Dehydrierung stattfindet als bei Verwendung des Sauerstoffs (10, 11). Auch Frey beobachtete dies an Atmungsversuchen, auf die ich noch zurückkommen werde. Er fand, daß Hefeextrakt bei Zusatz von Methylen einen starken Sauerstoffverbrauch aufweist, während ohne Methylenblau dieser ganz gering ist und gerade die Fehlergrenze überschreitet (3).

3. Theorie von Szent-Györgyi (26).

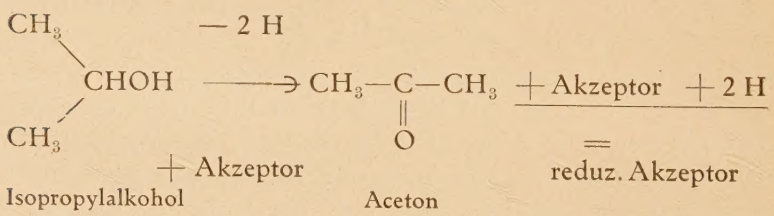
Diese ist eine Kombination der Wieland'schen und Warburg'schen. Zum Zustandekommen der biologischen Oxydationen sei das Ineinandergreifen von im Wieland'schen Sinne aktivierten Wasserstoff und von im Warburg'schen Sinne aktivierten Sauerstoff nötig. Der aktivierte Wasserstoff allein vermöge nicht den molekularen Sauerstoff zu reduzieren, sich also zu Wasserstoffsuperoxyd zu verbinden, wie auch der ak-

tivierte Sauerstoff den unaktivierten Wasserstoff nicht zu oxydieren imstande wäre.

Alle biologischen Oxydationen werden weder durch die eine noch die andere Theorie restlos geklärt. Auch die letztere vermag über den Verlauf der Dehydrierungen nicht vollständige Klarheit zu schaffen. Es ist sicher, daß sehr viele biologische Oxydationen nach dem Typus der Dehydrierungen verlaufen, aber auch das Warburg'sche Atmungsferment spielt dabei eine Rolle. Neuere Forschungen ließen den Schluß zu, daß es weniger als Sauerstoffaktivator wirkt, als vielmehr in der Eigenschaft eines Wasserstoffakzeptors, und zwar im Sinne eines künstlichen Wasserstoffakzeptors die Dehydrierung beeinflußt.

II. Problemstellung.

Meine Untersuchungen beruhen auf folgender spezifischer Dehydrierung: Isopropylalkohol wird durch eine Dehydrase der Hefe bei Gegenwart von Akzeptoren zu Aceton dehydriert nach der Formel:



Als Akzeptor hinzugefügtes Methylenblau nimmt die beiden Wasserstoffatome auf und wird dabei reduziert zu farblosem Leukomethylenblau. Diese Reaktion muß unter Luftabschluß vor sich gehen, denn sonst würde das farblose Leukomethylenblau wieder zu Methylenblau durch den Luftsauerstoff oxydiert, man würde keine Entfärbung feststellen können.

Über das Vorkommen dieser Dehydrase (20) und ähnlicher Alkoholdehydrasen, schrieben Buchner und Mitarbeiter, daß sie in getöteten Essigbakterien enthalten seien. Es war aber

nicht möglich die Dehydrase von den getöteten Essigbakterien zu trennen. Außerdem ist Alkoholdehydrase in Leberpräparaten (Batelli und Stern), ferner in Pflanzen und Tierextrakten gefunden worden (Thunberg bezw. Ahlgreen). Die Dehydrierung (Oxydation) von Alkohol zu Acetaldehyd durch lebende Hefe mit Methylenblau als Wasserstoffakzeptor und anderen Akzeptoren ist von Wieland und Claren (19) erforscht worden. Aber alle diese Untersuchungen wurden mit lebenden Hefezellen ausgeführt.

Müller (20, 21, 22) hat die Dehydrierung des Isopropylalkohols zu Aceton nicht mit lebenden Hefezellen ausgeführt, sondern mit einem nach bestimmter Fällung hergestellten Macerationssaft. Mit dieser von den Hefezellen befreiten Fermentlösung machte er verschiedene Versuche, die ich kurz zusammenfassen möchte.

1. Entfärbungsversuche nach Thunberg, auf deren Methode ich später zurückkommen werde, in denen er feststellt, daß Isopropylalkohol und Aethylalkohol die Entfärbungszeit eines Gemisches von Methylenblau und Fermentlösung seiner Fällung auf ein Viertel herabsetzten, d. h. daß in der Fermentlösung unter anderen Dehydrasen auch die spezifische Isopropylalkoholdehydrase vorhanden ist, welche Isopropylalkohol zu Aceton dehydriert, wobei das tief dunkelblaue Methylen zum farblosen Leukomethylen reduziert wird. Die Zeit, die diese Dehydrierung beansprucht, wird gemessen an der Zeit der Entfärbung. Je nachdem, ob die Entfärbung rascher oder langsamer vor sich geht, kann man schließen, ob die Dehydrase stark oder schwach ist.

Eine Entfärbung, gleichgiltig, auf welcher Dehydrierung sie beruht, findet fast immer statt. Man nennt diesen Vorgang eine Restreduktion. Nur dauert diese Entfärbung meistens mehrere Stunden. Man kann also nur dann von einer Entfärbung durch eine spezifische Dehydrasewirkung sprechen, wenn die Entfärbungszeit sehr kurz ist, zumindest im Vergleich zur Restreduktion wesentlich herabgesetzt ist.

2. Acetonbestimmungsversuche, in denen nach bestimmter Methode die Bildung von Aceton qualitativ und quantitativ nachgewiesen wird und durch die Müller zu dem Schlusse kommt, daß die Isopropylalkoholdehydrase eine Aerodehydrase sei (20, 21, 22).

Was ist nun eine Aerodehydrase?

Bis jetzt war die Rede davon, daß z. B. Milchsäure durch ein Ferment des Hefeextrakts bei Gegenwart von Methylenblau als Akzeptor zu Brenztraubensäure dehydriert wird, wobei Leukomethylenblau entsteht, bei einer Entfärbungszeit von ca. 8—10 Minuten. Damit ist also sicher die Dehydrase nachgewiesen noch dazu, wenn durch gewisse Bestimmungsversuche eine deutliche Milchsäureabnahme feststellbar ist. Was ist aber der Fall, wenn nicht Methylenblau, der künstliche Akzeptor, verwendet, sondern die Dehydrierung mit Sauerstoff, dem natürlichen Akzeptor, vorgenommen wird.

Bei Versuchen mit Hefeextrakt, der eine starke Milchsäuredehydrase enthält, fanden Hahn und Mitarbeiter (10), daß bei Verwendung des Sauerstoffs keine Milchsäureabnahme und Bildung von Brenztraubensäure festzustellen ist, daß also die Wirkung des Sauerstoffs praktisch gleich Null ist.

Tab. 1 (10, Tab. 3). Milchsäure in Milligramm.

Nr.	direkt	dig. mit O_2	dig. mit Meth.	Dauer
1	29.0	28.3	22.8	4
2	69.5	69.2	54.5	4
3	56.0	56.5	40.5	5
4	57.0	56.5	44.0	4

Bemerkung: Unter Digestion bezw. digerieren versteht man das Schütteln eines Versuchsgemisches im Thermostaten bei einer bestimmten Temperatur, in unserem Falle 34—36 Grad.

Ergebnis: Die Abnahme der Milchsäure bei Dig. mit Sauerstoff ist gleich Null

Die Abnahme bei Methylen beträgt durchschnittlich 24 %.

Es spielen sich also in Dehydraselösungen mit Milchsäure und Methylenblau Dehydrierungen ab, in Dehydraselösungen mit Milchsäure und Sauerstoff dagegen nicht. Auch Bernheim (Biochemical J. 22, 605, 1928), Stephenson (Biochem. J. 22, 605, 1928) und Harrison (Biochem. J. 25, 1016, 1931) konnten diese Tatsache bei anderen Fermenten beobachten. Ebenso fand Frey (3), wie ich schon erwähnte, in dieser Linie liegende Ergebnisse.

Man muß also vermuten, daß die Bedingungen für den Dehydrierungsmechanismus zur Erklärung der Sauerstoffwirkung nach Wieland bei den biologischen Oxydationen nicht ausreichen. Es muß in der frischen Hefeextraktlösung noch ein Stoff vorhanden sein, der neben Milchsäure, Milchsäuredehydrase und Sauerstoff notwendig ist, die Dehydrierung der Milchsäure zu erfüllen. Ich sagte oben „in frischer Hefeextraktlösung". Man ist nämlich bei Atmungsversuchen mit Barcroftmanometern (3) zu dem Ergebnis gekommen, daß durch diesen frischen Extrakt eine geringfügige Abnahme der Milchsäure zustande kommt, bei älterem Extrakt dagegen nicht. Dieser obengenannte Stoff muß also sehr labil sein.

Eine Dehydrase ist also dann eine Aerodehydrase, wenn bei ihr dieser sauerstoffübertragende Stoff nicht notwendig ist, wenn Sauerstoffüberträger und Dehydrase ein Ferment darstellen. Es fragt sich nun, welche Rolle dieser besagte Stoff, den man mit dem Namen Sauerstoffüberträger bezeichnen kann, aber nur zwecks einfacherer Ausdrucksweise, im Verlauf der Dehydrierung spielt, und welcher Art seine sauerstoffübertragende Funktion ist.

1. Er kann im Sinne des Warburg'schen Atmungsfermentes den Sauerstoff aktivieren. Dann müßte die Oxydation aber doch eine Eisenkatalyse darstellen.

2. Er kann selber ein Wasserstoffakzeptor sein, ähnlich dem Methylenblau. Seine Wirkung wäre folgendermaßen:

Die von der Dehydrase freigemachten Wasserstoffatome werden vom Sauerstoffüberträger aufgenommen. Er wird dabei reduziert. Die Rolle des molekularen Sauerstoffs stellt man weiterhin sich so vor, daß er den durch die freigewordenen Wasserstoffatome reduzierten Sauerstoffüberträger wieder oxydiert, so daß dieser in den Oxydationsprozeß erneut eingreifen kann. Man kam auf diese Gedankengänge durch die Wirkung des Methylenblaus. Wie oben erwähnt, wird dieses beim Dehydrierungsvorgang im Vakuum zu farblosem Leukomethylenblau reduziert, bei Sauerstoffzutritt aber sofort wieder oxydiert zum ursprünglichen Methylenblau. Es findet hiermit also eine Regeneration statt. Ebenso stellt man sich die Funktion des Sauerstoffs gegenüber dem Sauerstoffüberträger vor, er regeneriert diesen.

B. Experimenteller Teil.

Meine Aufgabe war es, zu untersuchen, ob diese Isopropylalkoholdehydrase wirklich eine Aerodehydrase ist, und welche Rolle bei dieser Dehydrierung der Sauerstoffüberträger spielt.

Als Fermentlösungen benutzte ich drei verschiedene: 1. die Hefeextraktlösungen nach Hahn und Mitarbeiter (9), 2. den Macerationssaft nach Lebedew (17) und die Müllerlösung nach Müller (20, 21, 22).

I. Versuche mit Hefeextrakt.

Herstellung (9): 200 g frische Preßhefe der Löwenbrauerei werden in einem größeren Gefäß mit 15 ccm Essigester versetzt. Nach einigen Minuten Stehenlassen und kräftigem Umrühren ist eine homogene, zähe Flüssigkeit entstanden, die man mit ca. 170 ccm Wasser verdünnt. Dieselbe reagiert beim Prüfen mit Lakmuspapier sauer und wird mit 5%igem

Ammoniak neutralisiert. Daraufhin gießt man die Flüssigkeit in eine große Glasflasche, die mit einem Ventilstopfen versehen ist und läßt sie auf einem Schüttelwagen schütteln. Dabei findet Gasentwicklung statt, wobei die Flüssigkeit wiederum saure Reaktion annimmt und infolgedessen in gewissen Abständen neutralisiert werden muß. 8—9 Stunden schüttelt diese Mischung, über Nacht wird sie in einen Kühlschrank gestellt, am nächsten Tage nochmals 2 Stunden geschüttelt und dann abfiltriert. Man erhält einen gelblich-braungefärbten Extrakt, in dem sich die verschiedensten Fermente der Hefe befinden.

Um festzustellen, ob in dieser Extraktlösung das spezifische Ferment, welches ich zu meinen Versuchen benötigte, vorhanden ist, stellte ich Entfärbungsversuche nach Thunberg (27) und der von Hahn und Mitarbeitern (5) angegebenen Modifikation an.

a) Entfärbungsversuche mit Methylenblau.

Man gibt den zu untersuchenden Extrakt in ein gewöhnliches Reagensglas, dazu Methylenblau und den sogen. Donator d. i. in unserem Falle Isopropylalkohol. Ferner setzt man einen zweiten Versuch an, in dem der Donator ersetzt ist durch die gleiche Menge Wasser. Im ersteren Falle tritt unter folgenden Bedingungen, nämlich im Vakuum, und bei einer Temperatur von 37^0 eine Entfärbung des Reaktionsgemisches nach kurzer Zeit ein, während im zweiten Falle nur die sog. Restreduktion vorhanden ist und der Versuch erst nach mehreren Stunden entfärbt wird.

Um zu evakuieren, wird das Reagensglas mit einem Stopfen, der in einer Durchbohrung eine Glasröhre enthält, verschlossen, mit dem mittleren Teil wird es über der Flamme des Bunsenbrenners solange erwärmt, unter ständigem Rotieren, bis es zu einer dünnen Röhre ausgezogen werden kann. Mit Hilfe der Glasröhre des Stopfens schließt man das dünn ausgezogene Reagensglas an eine Wasserstrahlsaugpumpe an und evakuiert solange, bis das Manometer das Vakuum anzeigt, wobei das

dem Stopfen entgegengesetzte Ende der Glasröhre dauernd gekühlt werden muß, weil andernfalls durch das entstehende Vakuum der Inhalt zum Kochen gebracht wird und schäumt. An der Stelle, an der das Reagensglas zu einer dünnen Glasröhre ausgezogen worden ist, wird es nun während des Evakuierens abgeschmolzen, so daß man ein luftleeres zugeschmolzenes Reagensglas erhält, in dem sich der zu untersuchende Ansatz befindet.

Man stellt dieses nun in einen auf 37° erwärmten Wasserthermostaten, dessen Wände durchsichtig sind, sodaß nach gewisser Zeit die Entfärbungsdauer kontrolliert werden kann. Der zweite Ansatz, der sog. Nullversuch, wird auf die gleiche Art evakuiert.

In unserem Hefeextrakt ist die spezifische Isopropylalkoholdehydrase dann vorhanden, wenn die Entfärbungsdauer des ersten Versuches wesentlich kürzer ist, als die des Nullversuches.

Tab. 2. Entfärbungszeit in Minuten.

Nr.	Null	Isop. 2%	Isop. 10%	Ansatz:
				0,2 ccm Hefeextrakt
1	51	45	38	0,2 ccm Methylenblau (1 : 1000) in Phosphatpuffer m/15 p = 7
2	180	180	180	
3	215	217	216	0,8 Isopropylalkohol

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, zeigt die Entfärbungszeit aller drei Versuche keine wesentlichen Differenzen. Auch die Konzentration des Isopropylalkohols spielt keine Rolle.

Nach dem eben Gesagten muß man zu dem Schluß kommen, daß in dem Hefeextrakt, in welchem wie Hahn und Mitarbeiter (9) zeigten, die verschiedensten Dehydrasen und vor allem eine starke Milchsäuredehydrase vorhanden sind, die spezielle Isopropylalkoholdehydrase nicht enthalten ist. Um in dieser Tatsache sicher zu gehen, wurden Acetonbestimmungs-

versuche angestellt. Falls die Dehydrase doch vorhanden wäre, konnte ich durch noch folgend angegebene Versuche, den durch sie gebildeten Aceton qualitativ und quantitativ nachweisen.

b) Acetonbestimmungsversuche mit Hefeextrakt.

Tab. 3. Aceton in Milligramm.

Nr.	Methylenblau		Sauerstoff		Bem.
	ohne Iso	mit Iso	ohne Iso	mit Iso	
1	2.52	2.91	2.41	2.41	2
2	3.59	4.01			2

Ansatz: 20 ccm Hefeextrakt
15 » Methylenblau 1.25 %
10 » Isopropyl.
Temperatur 34°. Dauer des Schüttelns unter Bem. angeführt.

Ein Nachweis des Acetons mit den folgend angeführten Methoden gelang nicht. Die Proben waren negativ. Somit keine Acetonbildung. Aus der Tabelle ist ersichtlich:

1. Die angebliche Acetonbildung ist sehr gering, überschreitet die Nullwerte kaum.
2. Bei Verwendung des Sauerstoffs als Akzeptor findet überhaupt keine Zunahme des angebl. Acetonwertes gegenüber dem Nullwert statt.

Prinzip der Methode.

Man läßt die Dehydrase der Fermentlösung unter den gleichen Bedingungen wie beim Entfärbungsversuch nur in größeren Konzentrationen Aceton bilden, der abdestilliert wird, eine Probe des Destillats dient zum Nachweis, das übrige wird quantitativ durch Titrieren bestimmt.

Ausführung eines Versuches.

Zu den Versuchen dürfen nur gut gereinigte und getrocknete Gefäße verwendet werden. Größe ungefähr folgende:

Länge 35 cm, Breite 4 cm. In dieses Gefäß kommt der zu untersuchende Extrakt mit seinen Zusätzen. Es wird wiederum mit einem durchbohrten und mit Glasröhre versehenem Stopfen verschlossen und unter möglichst wenig Schütteln mindestens 10 Minuten gekühlt, um auch hier ein Kochen und Überschäumen der zu evakuierenden Flüssigkeit möglichst zu vermeiden. An einer Wasserstrahlpumpe wird evakuiert, bis das angeschlossene Manometer das Vakuum anzeigt, dann mit einer Klemme abgeschlossen und schließlich stellt man das Glasgefäß in einen Thermostaten, wo es bei einer Temperatur von 34° beliebig lange, aber mindestens zwei Stunden schütteln muß.

Hefe enthält bekanntlich viel Eiweiß, da dieses beim Erhitzen und Kochen stark schäumt, wäre eine Destillation des Hefeextraktes unmöglich. Aus diesem Grunde muß der Hefeextrakt nach Ablauf der Digestion (Schütteln) folgendermaßen enteiweißt werden:

Man gießt den Inhalt des Reagensglases durch einen Trichter in einen Erlenmeyerkolben von 200 ccm, gibt zuerst unter Umschütteln ca. 20 ccm einer 4,4%igen Salzsäure und darauf 40 ccm einer gesättigten Sublimatlösung hinzu, nicht ohne vorher das zum Versuch gebrauchte Reagensglas mit beiden Flüssigkeiten gut ausgespült zu haben. Man sieht deutlich wie das Eiweiß mit Methylenblau als violetter Niederschlag ausfällt, schüttelt nun ca. 10 Minuten kräftig, verschließt dann die Erlenmeyerkolben um ein Verdunsten des Acetons zu verhindern und stellt dieselben über Nacht in den Kühlschrank. Am nächsten Tag wird der Niederschlag filtriert unter dreimaligem Nachwaschen des Filtrats mit Sublimatlösung.

Acetonbestimmung (14, 28, 24).

Prinzip der Acetonbestimmung: Dieselbe beruht auf der Liebens'chen Jodoformprobe (14). Ich stütze mich bei der Acetonbestimmung auf die von Huppert-Messinger und

Emden-Schmitz angegebene Modifikation der Lieben,schen Jodoformprobe.

Aceton besitzt die Fähigkeit, aus einer alkalisch gemachten Jodlösung Jodoform auszufällen. Zur Acetonmengenbestimmung verwendet man einen Überschuß von Jodlösung. Ein Teil des Jodes wird vom Aceton benötigt zur Bildung von Jodoform. Der freibleibende Rest wird durch Natriumthiusulfat titriert und an der Differenz des Restes zur ursprünglich dazugegebenen Menge kann man den Verbrauch der Jodlösung durch Aceton messen und damit den Gehalt des Destillats an Aceton bestimmen.

Ausführung eines Versuches.

Die nach dem Enteiweißen und nach Filtrieren erhaltene Flüssigkeit wird auf ca. 170 ccm (siehe 14) Gesamtmenge verdünnt und destilliert. Die stark gekühlte Vorlage wird mit 50 ccm Wasser beschickt. Es wird solange vorsichtig destilliert, bis ca. 60 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit übergegangen sind. Nach sofortigem Spülen kann titriert werden (Dauer der Destillation ca. 25 Minuten). In den Erlenmeyerkolben, der die 60 ccm übergegangenes Destillat und die dazugegebenen 50 ccm Wasser enthält, kommen jetzt 30 ccm Kjeldahl-Lauge, um das Destillat alkalisch zu machen. Nun läßt man unter Umschütteln aus der einen Pipette 40 ccm n/10 Jodlösung einlaufen. Es entsteht entweder ein gelber Niederschlag von Jodoform oder bei Abwesenheit von Aceton eine leichte Gelbfärbung der Flüssigkeit. Beide Erscheinungen können manchmal sofort nach Zugabe der Jodlösung eintreten, manchmal erst nach Stehenlassen. Um das freie, durch Aceton nicht verbrauchte Jod sichtbar zu machen, gibt man dem Gemisch durch Hinzufügen von ca. 60 ccm 25%iger Salzsäure saure Reaktion, läßt etwas Stärke einträufeln und erhält eine schöne Blaufärbung. Mit n/10 Natriumthiusulfat wird solange titriert, bis die Blaufärbung verschwindet. Die Menge des zum Farb-

umschlag benötigten Natriumthiusulfats entspricht der Menge des unverbrauchten Jods.

Beispiel. Man hat dem Destillat zugefügt:

	40 ccm n/10 Jodlösung
Zum Farbumschlag benötigt:	30 ccm n/10 Thiusulfat
Dann verbrauchte Aceton	10 ccm zur Jodoformbildg.

Durch Multiplikation mit einem Faktor (0,967) erhält man den dem Jodverbrauch entsprechenden Acetonwert in diesem Falle

10 mal 0,967 = 9,67 Milligramm Aceton.

Diese Acetonbestimmung ist aber nur für die Messung des Acetongehaltes im Harn maßgebend. Um die Genauigkeit dieser Methode bei den Untersuchungen des Hefeextraktes festzustellen, setzte ich folgende Versuche an:

Ansatz in ccm:	110 Wasser
	40 Hefeextrakt (enteiweißt)
	20 Acetonlösung (enthält ca. 20 mgr Aceton)
	170 Gesamtmenge.

Tab. 4. Acetonwerte in Milligramm.

Nr.	Aceton (hinzugefügt)	Aceton (bestimmt)	Bemerkung
1	ca. 20	20.382	Acetonlösung: 1 Liter Wasser 1 g Aceton darin gelöst
2	» 20	21.543	
3	» 20	21.324	
4	» 40	41.33	

Ergebnis: Die Tabelle zeigt uns, daß mit Hilfe dieser quantitativen Methode eine sehr genaue Bestimmung der Acetonmenge möglich ist.

Qualitativer Nachweis des Acetons (4, 23, 1, 15).

Den qualitativen Nachweis des Acetons zu führen ist schwierig, denn fast alle in der Literatur angegebenen Bestimmungen und Proben sind nicht spezifisch auf Aceton, denn auch andere Substanzen, wie z. B. Acetaldehyd, Acetessigsäure, gewisse Oxy- und Ketofettsäuren geben die gleichen Reaktionen. Der bekannte Natrium-Nitroprussidnachweis des Acetons im Harn war mit den vorhandenen geringen Konzentrationen nicht ausführbar.

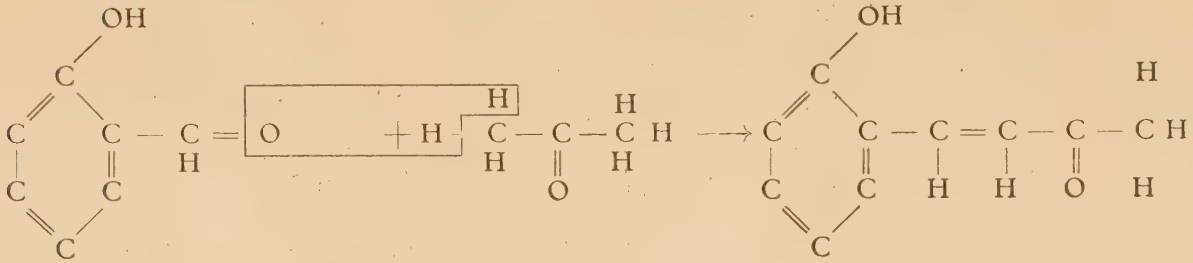
1. Acetonprobe nach Frommer (4).

10 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit kommen in ein Reagensglas, dazu einige Tropfen Salizylaldehyd, der in absolutem Alkohol gelöst ist (1 Teil Salizylaldehyd und 10 Teile absol. Alkohol). Es erfolgt eine weißlich-gelbe Trübung, die bei Zusatz von ca. 1 gr. Ätzkali verschwindet. Bei der entstehenden Eigenwärme oder bei leichtem Erwärmen im Wasserbad von 50°, ist an der Berührungsstelle des sich gerade in Lösung befindlichen KOH und der übrigen Flüssigkeit ein purpurfarbener Ring, das Kennzeichen des Vorhandenseins von Aceton, zu bemerken. Nach längerem Stehenlassen verbreitet sich die Purpurfärbung über die ganze Flüssigkeit, beim Fehlen von Aceton bleibt dieselbe farblos.

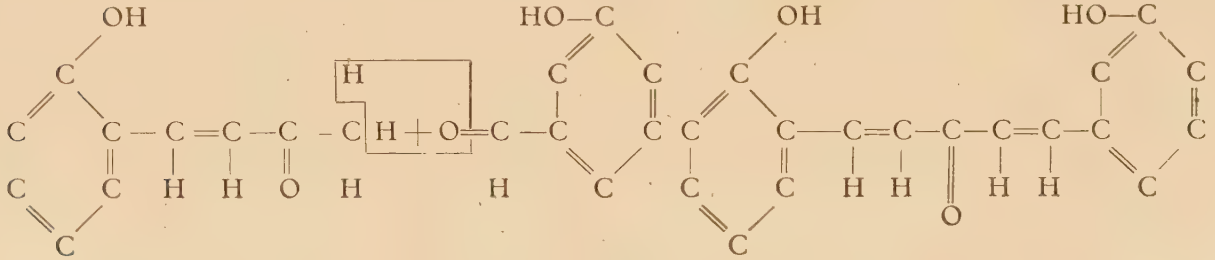
Müller (23) wandte auch diese Probe an, wenn auch in anderer Modifikation. Er nimmt 10 ccm der Flüssigkeit, fügt 5 ccm 20%iger KOH hinzu, ferner 0,5 ccm der gleichen Salizylaldehydlösung, erwärmt im Wasserbad 20 Minuten auf 50° und erhält nach 24 stündigem Stehen eine gelblich-braun bis rote Färbung.

Chemischer Vorgang bei der Frommer'schen Probe.

Salicylaldehyd + Aceton gibt Oxybenzoylaceton + H_2O



Bei Anwesenheit starker Alkalien (KOH) geht diese Verbindung mit Salicylald. durch Kondensation eine neue Verbindung ein.



Dieser Nachweis gelang bei sehr geringen Konzentrationen von noch 0,5 mgr Aceton.

Obwohl Müller zu seinen Untersuchungen immer diese Acetonprobe benutzte, mußte ich eine ganz neue spezifische finden, denn es stellte sich heraus, daß die oben angegebene nicht nur für Aceton gilt, da Acetaldehyd auch diese gelblich-braune Färbung hervorruft, wie eigene Versuche ergaben.

Ein rein spezifischer Nachweis des Acetons ist die von Gunning bezw. von Le Nobel angegebene Acetonprobe (26, 27). Zu diesem Zwecke fügt man zu 5 ccm des erhaltenen Destillats die gleiche Menge 10%iges Ammoniak hinzu. Vorher bereitet man sich eine Lösung von Jod in Jodammonium. Auch hierfür ist keine Vorschrift gegeben. Man gibt nun soviel dieser Jod-Jodammoniumlösung hinzu, bis der dabei entstehende schwarze Niederschlag von Jodstickstoff nicht mehr verschwindet. Erst nach längerem Stehen macht dieser, bei den niedrigen Acetonmengen, die nachzuweisen sind, einer Entfärbung Platz und am Boden der nun klaren Lösung sind schöne, gelbliche Jodoformkristalle zu bemerken. Ist kein Aceton vorhanden, so bilden sich keine Kristalle.

Grenze: 0,5 mgr Aceton.

Mit diesen beiden Methoden untersuchte ich zuerst den zum Hefeextrakt und zu allen Versuchen verwendeten Isopropylalkohol in Bezug auf seine Reinheit von Aceton. Es waren keine Verunreinigungen vorhanden, sodaß von dieser Seite irgendeine Beeinflussung der Werte der durch die Dehydrasewirkung gewonnenen Acetonmengen ausscheidet.

Wie aus den Tabellen 2 und 4 hervorgeht, ist keine Isopropylalkoholdehydrase im Hefeextrakt enthalten und schritt ich nun zur Untersuchung des Lebedewsaftes.

II. Versuche mit Lebedewsaft.

Lebedewsaft (17) wird aus Trockenhefe gewonnen. Diese muß nach bestimmter Methode gewaschen und getrocknet werden. Schlecht gewaschene Hefe beeinflußt leicht erklärlicherweise den Ablauf der Fermentreaktionen, denn es sind

dann gewisse Stoffe, vor allem vergärbare, enthalten, die durch das Waschen nicht entfernt worden sind.

Zum Quantum Trockenhefe kommt im Verhältnis 1 : 3 Wasser, beides wird zu einem dicken klumpenfreien Brei verrührt und in einem Trockenthermostaten bei 38° 2 Stunden lang stehen gelassen. Über Nacht erfolgt die Filtrierung dieses Breies im Kühlschrank. Man erhält einen gelbbraunen Macerationssaft. Dieser wurde auf die spezifische Dehydrase untersucht.

a) Entfärbungsversuche mit Methylenblau.

Tab. 5. Entfärbungszeit in Minuten.

Nr.	Null	Isop. 1 %	Isop. 5 %	Isop. 10 %	Laktat	Ansatz:
						0.2 ccm Lebedew
1	27	15	17	12	4	0.2 » Methyl. 1:1000
2	21		12		4	0.8 » Donator

1. Schon diese Entfärbungsversuche zeigen uns das Vorhandensein der Isopropylalkoholdehydrase im Lebedewsaft.

2. Die Restreduktion ist sehr stark (27 Minuten).

3. Milchsäuredehydrase ist viel stärker als die Isop. Dehydrase (Laktat braucht nur 4 Minuten).

4. Die Konzentration des Isopropylalkohols hat nur geringen Einfluß.

b) Acetonbestimmungsversuche.

Tab. 6. Aceton in Milligramm.

Nr.	Methylenblau		Sauerstoff		Ansatz:
	ohne Isop	mit Isop	ohne Isop	mit Isop	20 ccm Lebedew
1	4.01	9.01			15 » Methylen 1:25 bezw. Wasser
2	4.12	10.02	4.83	1.93	10 » 5 % Isop. bezw. Wasser

Dauer der Digestion 2 Stunden.

Ergebnis: 1. Starke Acetonbildung mit Methylen
2. Acetonbildung mit Sauerstoff geringer
3. Starke Nullwerte

Die Versuche mit Lebedewsaft wurden nicht fortgesetzt. Die Isopropylalkoholdehydrase ist im Lebedewsaft nicht lange haltbar, sie wird schnell zerstört. Außerdem sind in diesem Macerationssaft soviele Dehydrasen und andere Stoffe enthalten, die irgend eine Beeinflussung der durch Fermentreaktion erhaltenen Werte ermöglichen, sodaß sich keine einheitlichen Resusultate ergeben würden.

Ich benutze daher zu meinen weiteren Untersuchungen die von Müller angegebene Form einer länger haltbaren, sich wenig verändernden Fermentfällung.

Versuche mit Müller-Fällung.

Herstellung: 150 ccm Lebedewsaft läßt man unter ständigem Umrühren in ein Alkoholäthergemisch einträufeln, bestehend aus 1250 ccm 96%ig. Alkohol und 625 ccm Äther. Es tritt eine Fällung ein. Man saugt mittels einer großen Nutsche, in der sich ein Filter befindet, die Flüssigkeit vom Niederschlag ab und wäscht den im Filter bleibenden Rückstand sorgfältigst mit absolutem wasserfreiem Äther nach. Ist das Pulver nicht genügend getrocknet, so verklebt es und bekommt eine braune Farbe, während es normal schneeweiß ist. Sofort nach dem Waschen wird es in einem Calcium-Excikator aufbewahrt.

Ich habe mit dem Pulver folgende Beobachtungen gemacht: Es muß mindestens 24 Std. im Excikator gestanden haben, ehe es verwendungsfähig ist und darf nicht mehr nach Äther riechen. Aus 150 ccm verwendeten Lebedewsaft erhält man ca. 20 g Trockenpulver.

Um eine zu den Versuchen verwendbare Fermentlösung herzustellen, wird das Pulver wieder auf 150 ccm Wasser aufgeschwemmt, also auf die Ausgangsmenge Lebedewsaft. Nimmt man einen Teil des Pulvers, so hat dieser im gleichen Verhältnis zu stehen, nämlich wie 20 : 150. Da sich das Pulver sehr schwer in Wasser aufschwemmen läßt, zerstäubt man es

am besten in einem Mörser und verrührt es unter langsamer Wasserzugabe zu einem Brei, der schließlich mit dem ganzen Quantum verdünnt wird. Müller gibt nichts an, in welcher Weise er die Fermentlösung herstellt, auch nicht, ob er sie als Lösung oder als Suspension verwendet. Ich habe jedenfalls den verdünnten Brei nach etwa 30 Minutenstehenlassen abfiltriert und die so gewonnene klare, gelb-braune Fermentlösung verwendet. Sie enthält neben anderen Fermenten wie Tab. 7 zeigt, eine starke Milchsäuredehydrase (Entfärbungszeit 12 Minuten). Die Isopropylalkoholdehydrase ist nicht so stark — sie beansprucht 25 bis 40 Minuten. Nach 24 stündigem Stehen der Lösung im Eisschrank ist letztere bereits geschädigt und benötigt 55 Minuten, während sie nach 4 stündigem Stehen im Thermostaten bei 38° zerstört ist.

a) Entfärbungsversuche mit Methylenblau:

Tab. 7. Entfärbungsdauer in Min.

Nr.	Null	Isop. 5%	nach 4 Std.	nach 24 Std.	Ansatz:
1	240	25	30	55	0.2 Müllerlösung
2	267	23	32	58	0.2 Methyl. 1 : 1000
					0.8 5% Isop. bezw. Wasser

Tab. 8. Entfärbungsdauer in Minuten.

Nr.	Null	Isop. 5%	Isop. 10%	Laktat	Ansatz:
					0.2 Müllerlös.
					0.2 Methylen. 1:1000
					0.8 Iso. bezw. Wasser
1	263	48		12	**Bei Nr. 1 und 2**
2	167	32	40	11	0.2 Müller.
3	192	27	44	10	0.3 Methyl.
					0.8 Donator

Die Menge des dazugegebenen Methylenblaus ebenso wie die Konzentration des Isopropylalkohols haben Einfluß auf die Zeitdauer der Entfärbung, sie verlängern dieselbe. Die Entfärbungsversuche bestätigen also, daß die Isopropylalkoholde-

hydrase in Müller-Lösung enthalten ist und zeigen, daß diese nicht so stark wie die Milchsäuredehydrase wirkt. Sie nimmt nach längerem Stehen ab und wird leicht zerstört, wenn sie sich in Lösung befindet. Als Pulver dagegen nicht.

b) Acetonbestimmungsversuche.

Die Methodik zu diesen Untersuchungen erklärte ich bereits bei denjenigen des Hefeextraktes. Hier wurden folgende Ansätze verwendet.

20 ccm Müller-Extrakt
15 ccm Methylenblau 1,25 %ig
10 ccm Isopropylalkohol bezw. Wasser.

Ansätze mit 25—40 ccm Müller-Lösung ergaben die gleichen Werte, jedenfalls keine auffälligen Änderungen. Die Versuche wurden im Thermostaten bei 34° geschüttelt, meistens 2—3 Std. (In der Tabelle unter Digestion bezeichnet).

1. Verhalten mit Methylenblau.

Tab. 9. Aceton in Milligramm.

Nr.	Null = ohne Isop.	mit Isop.	Dauer	Ansatz: 20 ccm Müller, 15 ccm Meth. 1.25 %, 10 ccm 5 % Isop. bezw. Wasser
1	2.97	9.09	2 Std.	
2	2.42	10.55	3 „	
3	2.3	10.16	2 „	
4	3.1	7.83	2 „	
5	2.32	8.05	4 „	
6	2.34	8.85	3 „	

Die Versuche zeigen, daß eine Acetonbildung stattfindet. Die Ausbeute ist ziemlich gering. Es werden zu 45 ccm Flüssigkeit 500 mg Isopropylalkohol gegeben und man erhält in einer Gesamtmenge von 200 ccm 10 mg Aceton. Es liegt nicht an der Methode der Acetonbestimmung, denn diese ist, wie schon früher gezeigt, sehr genau, sondern an der Schwäche des Ferments.

Müller kommt bei seiner Arbeit über die Isopropylalkoholdehydrase zur Erkenntnis, daß dieselbe und der Sauerstoffüberträger ein Ferment darstellen, welches zugleich als Dehydrase wirkt und den Sauerstoff überträgt. Er nennt dieses Ferment eine Aerodehydrase. Müller hat aber in seinen Versuchen niemals die Wirkung der beiden Akzeptoren Sauerstoff und Methylenblau getrennt. Er stellte Versuche an mit Sauerstoff allein und mit Sauerstoff und Methylen vereinigt in Bezug ihrer Wirkung auf die Dehydrierung. Er fand eine noch wesentlich geringere Ausbeute an Acetonbildung.

Die oben angegebene Tabelle zeigt ferner eine fast konstant bleibende Höhe der Nullwerte. Dieselben wurden mit beiden Acetonproben (4, 23) untersucht, es wurde festgestellt, da die Proben negativ waren, daß es sich hier um keine Acetonbildung handeln kann. Vielmehr sind dies Stoffe, die in der Fermentlösung enthalten sind und die genau so wie Aceton die Lieben'sche Probe hervorrufen. Andererseits können durch fremde Fermentwirkung Stoffe hervorgerufen werden, wie z. B. Acetessigsäure, die auch die Jodoformprobe bildet.

2. Verhalten mit Sauerstoff.

Wiederum gibt man in eines der vorher erwähnten großen Reagensgläser die zur Dehydrierung nötigen Stoffe, also Müllerlösung, Isopropylalkohol, statt Methylenblau aber Wasser, kühlt, evakuiert etwas und schließt dann das Gefäß an einen Sauerstoffbehälter an, wo das Versuchsgemisch unter Umschütteln 5 Minuten mit Sauerstoff gesättigt wird. Darauf wird es in dem Thermostaten geschüttelt, nach Ablauf der Digestion enteiweißt und dann zur Acetonbestimmung geschritten.

Ansatz: 20 ccm Müller-Lösung
15 ccm Wasser statt Methylen
10 ccm 5% Isop. bezw. im Nullversuch Wasser.

Tab. 10.

Nr.	Null	Mit Iso	Dauer
1	0.97	5.71	3 Std.
2	0.97	4.60	3 „
3	1.45	4.35	5 „
4	1.55	3.40	6 „
5	0.96	3.59	4 „
6	0.38	3.79	3 „
7	0.19	5.45	3 „

Die Tabelle zeigt folgende Resultate:

1. Die Nullwerte sind herabgesetzt gegenüber den Nullwerten bei Methylen (vgl. Tab. 9).
2. Die Bildung von Aceton ist wesentlich geringer als die mit Methylenblau.

Tabelle No. 11 zeigt die Unterschiede der Acetonbildung bei Verwendung von Methylenblau und Sauerstoff als Akzeptor.

Tab. 11. Aceton in Milligramm.

Nr.	Meth. mit Iso.	Sauerst. mit Iso.	Dauer
1	10.16	5.34	3 Std.
2	7.38	5.24	2 „
3	8.03	3.01	3 „
4	8.75	5.73	3 „
5	8.05	3.59	4 „
6	7.86	3.79	3 „
7	9.99	5.45	3 „

Ergebnis: Man sieht eine durchschnittliche Abnahme der Sauerstoffwerte um 65 %. Ich habe hier mit der Müller-Lösung

ein Ergebnis erhalten, welches auf einer Linie mit der von Hahn und Mitarbeitern (10, 11) bei Hefe-Extrakt gefundenen Tatsache liegt, nämlich daß die Einwirkung von Sauerstoff auf Hefeextrakt sehr gering ist, ja, wenn man die Nullwerte abzieht, praktisch gleich Null ist.

Die Ursache der geringeren Acetonbildung kann man sich folgender Weise erklären:

a) Bei der Herstellung der Müllerlösung wird ein Stoff verwendet, der die Dehydrierung mit Methylenblau nicht beeinflußt, die mit Sauerstoff aber schädigt. Dies ist aber nicht möglich.

b) Man kann am ehesten annehmen, daß beim Verlauf der biologischen Oxydationen mit Sauerstoff noch ein Stoff nötig ist, der schon mehrmals erwähnte Sauerstoffüberträger. Dieser ist sehr labil. Die Versuche haben gezeigt, daß er schlecht von dem Müller-Extrakt aufgenommen und leicht zerstört wird. Für letzteres spricht die Tatsache, welche Hahn und Mitarbeiter fanden. Lebende Hefezellen oxydieren Milchsäure mit Sauerstoff, der aus ihnen gewonnene Saft dagegen zeigt keine Oxydation, d. h. in lebenden Hefezellen ist er noch erhalten, in daraus hergestelltem Extrakt aber nicht. Hahn und Fischbach schreiben darüber (10):

„Man muß daran denken, daß die Versuche mit Methylenblau also mit einem künstlichen Wasserstoffakzeptor, doch vielleicht eine gewisse Analogie zum Verhalten in der lebenden Hefezelle bilden. Daß in der Hefezelle Milchsäure durch Sauerstoff dehydriert werden kann, haben wir in eigenen Versuchen gezeigt. Auch ist dies in einer soeben erschienen Arbeit von Wieland, Claren und Pramanik geschehen. Daß ferner in den Zellen Stoffe mit Akzeptornatur vorkommen, haben wir für den Muskel wahrscheinlich gemacht, wo wir diese Stoffe als natürliche Akzeptoren bezeichnet haben. Wir verstehen darunter Stoffe mit Akzeptorwirkung, die teils als solche in der Zelle präformiert vorkommen, teils im Stoffwechsel gebildet

werden. Nun hat Warburg vor nicht allzulanger Zeit unter anderem in der Hefe einen Stoff entdeckt, den er als gelbes Oxydationsferment bezeichnet. Der Name „Ferment" wurde wohl deshalb gewählt, weil der Stoff beim Erhitzen auf 60° zerstört wird. Warburg hat selbst gezeigt, daß dieser Stoff als Akzeptor dienen kann und bei Gegenwart der entsprechenden Dehydrate im Vakuum in ein farbloses Reduktionsprodukt verwandelt wird. Durch Sauerstoff wird dieses wieder oxydiert. Das sogen. gelbe Oxydationsferment spielt somit im angegebenen Falle dieselbe Rolle wie in oben beschriebenen Versuchen das Methylenblau. Es ist der von Warburg entdeckte Stoff ein natürlicher Akzeptor in unserem Sinne."

Hieraus ergibt sich, daß der erwähnte Sauerstoffüberträger vielleicht in diesem Sinne ein natürlicher Akzeptor ist, welcher in der lebenden Zelle vorkommt, beim Herstellen des Hefeextraktes und der Müllerlösung aber ganz oder teilweise zugrunde geht. Daraus erklären sich die geringeren Werte, die bei den Versuchen mit Sauerstoff erhalten wurden gegenüber denen des Methylenblaus.

Atmungsversuche mit Müller-Lösung.

Um eine Stütze für die gefundenen Resultate zu bekommen, wurden Atmungsversuche angestellt, wobei ich hinsichtlich der Technik auf die angeführte Literatur (3, 25) verweise.

Prinzip: Es werden Barcroft-Manometer benutzt, ferner Manometergefäße nach Siebeck. In letztere gibt man die zu untersuchenden Ansätze. Die Gefäße sind abgeschlossen und werden ständig mit Sauerstoff gesättigt. Während der Dauer des Versuches wurden sie an das Manometer angeschlossen und in einem großen Wasserthermostaten bei 20° geschüttelt. Der Sauerstoffverbrauch, den die Ansätze zur Atmung verzehren wird gemessen.

Tab. 12. Sauerstoffverbrauch in cmm.

Nr.	ohne Methyl	mit Methyl	Zunahme	Bemerkung
1	14.5	50.0	200 %	schlechte Lösung
2	43.0	144.2	250 %	
3	44.1	80.0	100 %	

Ansätze: 1 ccm Müllerlösung
0.5 ccm 5 % Isop.
0.5 Methylen 1.25 % bezw. Wasser.

Ergebnis:

1. Im Ansatz, in dem der künstliche Akzeptor Methylenblau fehlt, also der natürliche Akzeptor Sauerstoff die Dehydrierung bewirken soll, entsteht nur ein geringer Sauerstoffverbrauch.

2. Die Sauerstoffzehrung steigt aufs 2—4fache bei Verwendung des künstlichen Akzeptors Methylenblau.

Ähnliche Resultate erhielt Frey (3) bei den Atmungsversuchen mit Hefeextrakt in Bezug auf die Sauerstoff- bezw. Methylenblauwirkung.

Ich habe nun durch Zugabe von verschiedenen Substanzen versucht, die Acetonbildung, die an und für sich bei den Versuchen mit Sauerstoff gering ist, ganz zu hemmen oder wenigstens herabzusetzen, dagegen die mit Methylenblau aufrecht zu erhalten. Der Sauerstoffüberträger sollte damit unwirksam gemacht werden, die Dehydrase dagegen nicht.

Ich ließ zu diesem Zwecke Toluol auf das Versuchsgemisch einwirken.

3. Verhalten mit Toluol.

Mit Wasser gewaschener Muskelbrei dehydriert Bernsteinsäure mit Methylenblau als Akzeptor sehr gut, ebenso mit Sauerstoff. (Hahn 12).

Mit Toluol gewaschener Muskelbrei dagegen dehydriert nur noch mit Methylenblau die Bernsteinsäure, mit Sauerstoff dagegen hat er diese Fähigkeit verloren. Das Dehydrierungsvermögen des mit Toluol gewaschenen Muskels gegenüber Bernsteinsäure mit Methylenblau hat somit nicht gelitten, während es mit Sauerstoff ganz aufgehoben ist. (12).

Folgender Ansatz wurde verwendet:

25 ccm Müllerlösung
10 ccm Methylenblau 1,25 % ig bezw. O_2 bzw. Wasser
10 ccm Isopropyl
3 ccm Toluol.

Toluol wurde mit den übrigen Bestandteilen durch kräftiges Schütteln durchmengt und dann die Suspension $^1/_2$ Stunde stehen gelassen.

Tab. 13. Aceton in Milligramm.

Nr.	Sauerstoff			Methylenblau		Dig.	Abnahme
	ohne Iso	mit Iso	Iso+Tol.	Iso+Tol.	Iso ohne Tol		
1	1.45	4.35	3.40	9.01	9.09	4	23 %
2	2.55	3.40	2.72	8.05	7.86	5	20 %
3	1.32	5.74	3.87	8.81	8.05	3	33 %

Ergebnis:

Eine vollkommene Hemmung der Acetonbildung mit Sauerstoff gelang mit Toluol nicht, aber eine deutliche Herabsetzung der Werte um durchschnittlich 25 %.

Die Dehydrierung mit Methylenblau war die gleiche mit und ohne Toluol. Es gelang also hier eine Schädigung des Sauerstoffüberträgers zu erreichen, dagegen keine d. Dehydrase.

4. Verhalten mit Phenylurethan.

Eine andere Substanz, von der bekannt ist, daß sie einen Einfluß auf die Extraktatmung ausübt, ist das Phenylurethan (Warburg 31). Dieses ist ein Narkotikum und wirkt auf die Zellatmung hemmend. Narkotica wirken aber nur dann, wenn

sie von den Zelloberflächen adsorbiert werden können. Im Müller-Extrakt sind aber keine ganzen Zellen, allerhöchstens Spuren von Zellbestandteilen vorhanden. Es dürfte eine Herabsetzung der Acetonbildung kaum stattfinden.

Frey (3) hat nachgewiesen, daß die Atmung einer Zellsuspension (Hefesuspension) durch Phenylurethan um 50% geschädigt wird, die Atmung des Hefeextraktes dagegen aber in keiner Weise gehemmt wird, da dieser eine zellfreie Fermentlösung dartellt.

Ansatz: 20 ccm Müllerlösung
15 » Methylen 1,25%ig bezw. Wasser
10 » Isop.
3 » gesättigte Phenylurethanlösung (n/100 Lösung).

Tab. 14. Aceton in Milligramm.

Nr.	Sauerstoff			Methyl	Dig.	Abnahme
	ohne Iso	mit Iso	Iso+Urethan	mit Iso		
1	1.55	3.40	3.29	7.81	6	Innerhalb der
2	1.05	3.87	3.67	8.71	4.5	Fehlergrenze

Ergebnis: Die Abnahme der Acetonwerte mit Phenylurethan liegt innerhalb der Fehlergrenze. Es hat also keine Beeinflussung des Sauerstoffüberträgers stattgefunden.

5. Verhalten mit Natriumfluorid.

Zur Verwendung von NaF und Ammoniumoxalat schreibt Lipmann (16). Beide Stoffe sollen die alkoholische Gärung sowohl in lebender Hefe als auch in Hefeextrakt in kleinen Konzentrationen hemmen., Meyerhof (19) findet eine Hemmung der Milchsäurebildung aus Polysacchariden durch Natriumfluorid und Ammoniumoxalat. Derselbe verwandte eine n/1000 NaF-Lösung. Wir verwandten eine n/20 Lösung.

Ansatz: 25 ccm Müllerlösung
20 ccm Methyl. 1,25%ig bezw. Wasser bezw. n/20 NaF.
10 ccm Isop. bezw. Wasser.

Natriumfluorid und Ammoniumoxalat mußten ähnlich dem Toluol erst eine halbe Stunde auf das Versuchsgemisch einwirken.

Tab. 15. Aceton in Milligramm.

Nr.	Methyl	Sauerstoff			Dig.	Abnahme
	mit Iso	ohne Iso	mit Iso	mit NaF		
1	7.86	0.38	3.79	2.69	3	26 %
2	9.99	0.19	5.45	4.15	3	23 %

Ergebnis: Die Werte der Acetonbildung, die man mit Sauerstoff als Akzeptor erhält, sind an und für sich schon gering. Wenn nun diejenigen, welche durch Beeinflussung mit Natriumfluorid entstehen, derartig kleine Differenzen ergeben, die aber die Fehlergrenze überschreiten, (26 und 23 % Abnahme), so muß man trotzdem zum Schluß kommen, daß eine Beeinflussung des Sauerstoffüberträgers stattgefunden hat.

6. Verhalten mit Ammoniumoxalat. (16, 19).

Ansatz: 25 ccm Müllerlösung
20 ccm Methyl 1,25 %ig bezw. Wasser bezw. n/5 Oxalat
10 ccm Isop. bezw. Wasser.

Tab. 16. Aceton in Milligramm.

Nr.	Methyl	Sauerstoff			Dig.	Abnahme
	mit Iso	ohne Iso	mit Iso	Oxal		
1	7.32	0.28	3.79	2.72	3	28 %
2	8.72	0.19	5.32	3.59	3	33 %

Bemerkung: Meyerhof verwandte eine 5/1000 n Oxalatlösung. Diese Konzentration ist für obige Versuche zu klein. Wir nahmen eine n/5 Ammoniumoxalatlösung.

Auch diese Versuche zeigen, daß eine Schädigung der Wirkung des Sauerstoffüberträgers eingetreten ist. Die Fähig-

keit der Dehydrase, Aceton zu bilden beim Hinzufügen von Methylenblau, wird in keiner Weise beeinflußt, denn ich erhielt bei Zugabe von Natriumfluorid oder Oxalat zu den Versuchen mit Methylenblau, Isopropylalkohol und Müllerlösung keine Abnahme der Werte, sondern ein Konstantbleiben derselben, (in Tabelle nicht angegeben).

7. Versuche mit Essigester.

Über den Einfluß des Essigesters auf Hefeextrakt und Hefesuspensionslösung stellten Hahn und Mitarbeiter fest (11), daß derselbe nach einer Einwirkungsdauer von ca. 40 Minuten auf die Fermentlösungen eine nur geringfügige Abnahme der Milchsäure zuläßt, im Vergleich zu der bei Methylenblau stattfindenden. Die Dehydrierung der Milchsäure zu Brenztraubensäure, welche durch die Abnahme der Milchsäure gekennzeichnet ist, wird durch Essigester somit gehemmt, wohl weil der Sauerstoffüberträger geschädigt worden ist und zwar sowohl in der Hefezelle wie auch im Lebedewsaft. Wenn also Essigester den Sauerstoffüberträger in Hefezellen zu schädigen vermag, so ist es, da er ja zur Herstellung von Hefeextrakt verwendet wird, leicht erklärlich, daß bei den Fermentreaktionen des Hefeextraktes mit Sauerstoff eine Hemmung des Dehydrierungsprozesses statthat.

Wie verhält sich nun der Essigester zur Müllerlösung?

Ansatz: 30 ccm Müllerlösung
20 » Methyl 1,25 %ig bezw. Wasser
10 » Isop. bezw. Wasser
3 » Essigester ($^1/_2$ Stunde Einwirkung).

Tab. 17. Aceton in Milligramm.

Nr.	Methyl mit Iso	Sauerstoff ohne Iso	Sauerstoff mit Iso	Dig.	Bemerkung
1	5.85	1.84	9.72	3	alle mit Essigester
2	8.35	1.91	14.35	4	
3	5.84	0.82	8.53	3	ohne Essigester
4	8.15	1.64	8.03	3	ohne Essigester, Müllerlösung 3 Std. bei Zimmertemp. u. 12 Std. im Kühlschrank stehenlassen

Aus der Tabelle ist ersichtlich:

1. Daß die gefundenen Acetonwerte bei Sauerstoff größer sind als diejenigen, welche bei Zugabe des künstlichen Wasserstoffakzeptors Methylenblau entstehen. Also umgekehrt wie in den übrigen Versuchen.
2. Daß bei längerem Stehen der Fermentlösung (3 Stunden Zimmertemperatur, 12 Stunden Kühlschrank) der Sauerstoffwert noch dem des Methylenblaus gleich ist.
3. Daß die Methylenblauwerte, die sonst fast konstant sind, schwanken.
4. Daß eine Beeinflussung mit Essigester nicht festzustellen ist.

Die nächstliegende Erklärung für die Erhöhung der Acetonwerte mit Sauerstoff als Akzeptor ist darin zu suchen, daß es sich hier nur um eine Müllerlösung handeln kann, in der der Sauerstoffüberträger besonders gut erhalten ist.

Aus obenerwähnter Tabelle ergibt sich eine Erhöhung der Acetonwerte mit Sauerstoff bei Zugabe von Essigester gegenüber denen ohne Sauerstoff, also in Nullversuchen. In anderen Untersuchungen, die drei Monate später angestellt wurden und die ich hier nicht angeführt habe, wurde teils eine Zunahme, teils eine Abnahme dieser Werte gegenüber denen des Nullversuchs festgestellt. Der Einfluß des Essigesters auf den Sauerstoffüberträger kann mit dieser Untersuchungsmethode nicht geklärt werden und es bedarf noch anderer Untersuchungen, um ihn klarzustellen.

8. Verhalten mit Lactat. im Entfärbungsversuch.

Um einen Vergleich zu den Entfärbungszeiten der Isopropylalkoholdehydrase in den sogen. Entfärbungsversuchen mit Methylenblau zu erhalten, wurde der Müllerlösung Laktat zugesetzt. Mit Hilfe des Laktats kann man die Stärke der Milchsäuredehydrase prüfen.

Die nachfolgende Tabelle zeigt ein überraschendes Ergebnis.

Ansatz: 0.2 ccm Müllerlösung
0.2 ccm Methylenblau 1:1000
0.8 % iges Lithiumlaktat bezw. 5 % Isop. bezw. Wasser.

Tab. 18. (Angabe in Minuten)

Nr.	Null	5 % Iso	1 % Laktat	Bemerkung
1	240	48	18	Müllerlösung
2	263	45	13	frisch
3	267	32	11	frisch
4	∞	65	13	2 Monate altes Trockenpulver
5	∞	∞	15	4 „ „ „
6	∞	∞	18	4 „ „ „

Ergebnis:

1. Die Entfärbungsdauer des Methylenblau auf Zusatz von Laktat ist bedeutend kürzer als die des Isopropylalkohols.

2. Somit ist die Milchsäuredehydrase in der Müllerlösung bedeutend stärker als die Isopropylalkoholdehydrase.

3. Milchsäuredehydrase ist noch nach 2 und 4 Monaten Stehenlassens des Trockenpulvers sehr stark, während die Isopropylalkoholdehydrase nach 2 Monaten schon schwächer und nach 4 Monaten bereits erloschen ist.

Wie schon früher erwähnt, enthält der von Hahn und Mitarbeitern (9) hergestellte Hefeextrakt eine starke Milchsäuredehydrase. Durch Milchsäureabnahmebestimmungen zeigten Hahn und Mitarbeiter (9, 10), daß der künstliche Akzeptor Methylenblau auf die Fermentlösung einen ziemlich starken Einfluß ausübt, d. h. daß die gemessene Milchsäureabnahme stark ist, während die, die man mit Sauerstoff erhalten sollte, gleich Null ist. Es war interessant festzustellen, wie sich die Milchsäuredehydrase der Müllerlösung in diesem Falle verhält.

Milchsäureabnahmebestimmung (5, 6).

Prinzip:

Zu Müllerlösung wird Laktat zugesetzt, ferner Methylenblau bezw. Sauerstoff. Es wird evakuiert. Nach mehrstündigem Digerieren im Thermostaten bei 34° wird die stattgefundene Milchsäureabnahme gemessen. Man setzt z. B. drei Versuche an.

1. Der erste Ansatz enthält Müllerlösung, Laktat und Methylenblau. Es wird nicht digeriert, die Milchsäure wird gleich bestimmt, folglich hat die Dehydrase keine Zeit, Milchsäure in Brenztraubensäure zu dehydrieren. Man erhält bei der Messung einen bestimmten Wert, der zu Vergleichszwecken dient.

2. Der Ansatz enthält Müllerlösung, Laktat und Methylenblau, wird zwei Stunden oder länger digeriert. Durch Dehydrasewirkung findet eine Milchsäureabnahme statt im Vergleich zum ersten Wert.

3. Der Ansatz enthält Müllerlösung, Laktat und statt Methylenblau Wasser. Es wird nicht evakuiert, sondern das Gemisch mit Sauerstoff gesättigt, ebensolange digeriert wie Nr. 2 und die Milchsäureabnahme gemessen.

Tab. 19. Abnahme in Milligramm.

Nr.	Direkt	Methyl.	Sauerstoff	Ansatz:
				15 ccm Müllerlösung
1	46.8	24.4	42.8	15 » Methylenblau 1.25 %ig
2	46,4	27.6	44.0	1 » Laktat 2% ig.

Ergebnis:

1. Die Abnahme der Milchsäure mit Methylenblau beträgt ca. 50% (46 : 24).

2. Die Abnahme mit Sauerstoff nur ca. 5%, liegt also innerhalb der Fehlergrenze (46 : 42).

Die Müllerlösung verhält sich also genau so wie der oben erwähnte Hefeextrakt. Die Dehydrierung ist fast Null beim natürlichen Akzeptor Sauerstoff, während sie beim Methylen starke Werte zeitigt.

C. Ergebnisse.

1. Die Methylenblauwirkung auf Müllerlösung bei Zugabe von 5 %igem Isopropylalkohol ist nicht gleich der Sauerstoffwirkung unter denselben Bedingungen.
2. Toluol hemmt die Wirkung des Sauerstoffüberträgers um 25 %.
3. Phenylurethan hat keinen Einfluß auf den Sauerstoffüberträger.
4. Natriumfluorid hemmt dessen Wirkung um 23 %.
5. Ammoniumoxalat um 29 %.
6. Einfluß des Essigesters nicht feststellbar.
7. Laktat zeigte das Vorhandensein einer starken und sehr lange haltbaren Milchsäuredehydrase.
   a) Auch bei dieser ist die Methylenblauwirkung nicht gleich der des Sauerstoffes.
8. Müllerlösung verhält sich in Bezug auf die Wirkung der beiden Akzeptoren ähnlich dem von Hahn und Mitarbeitern angegebenen Hefeextrakt.
9. Isopropylalkoholdehydrase ist keine Aerodehydrase.

D. Zusammenfassung.

Auf Grund vorstehender Untersuchungen muß man zum Schluß kommen, daß die Isopropyldehydrase der Müllerlösung keine Aerodehydrase darstellt, ebensowenig wie die Milchsäuredehydrase. Müller bleibt in seiner Arbeit über die Isopropyldehydrase den sicheren Beweis dafür, daß dieselbe eine Aerodehydrase sei, schuldig, denn er trennt niemals die reine Sauerstoffwirkung von der des Methylenblaus. Seine Untersuchungen beschränken sich auf das Verhalten von Sauerstoff allein gegenüber Sauerstoff und Methylenblau zusammen.

Unsere Untersuchung zeigte, daß die erhaltenen Werte für Methylenblau einerseits und Sauerstoff andererseits niemals gleich groß waren. Die Sauerstoffwirkung war in 10 Fällen kleiner und in vier Versuchen größer als die des Methylenblaus. Die Versuche sprechen also für ein Vorhandensein des Sauerstoffüberträgers in der Müllerlösung. Derselbe ist von der Dehydrase verschieden analog dem Hefeextrakt. In diesem Sinne sind auch die Versuche nach Zusatz von Toluol, Natriumfluorid und Ammoniumoxalat zu werten, wobei zwar die Oxydation durch Sauerstoff, nicht aber die Dehydrierung des Methylenblau geschädigt wird, offenbar durch einseitige Beeinflussung des Sauerstoffüberträgers.

Ferner verhält sich die Müllerlösung ähnlich wie der Hefeextrakt, bis auf folgenden Unterschied.

Der Sauerstoffüberträger wird bei der Herstellung der Müllerlösung nur geschwächt, er wird nicht ganz vernichtet wie beim Hefeextrakt, denn die Sauerstoffwirkung ist deutlich, wenn auch geringer wie die des Methylenblaus.

Den Nachweis, daß die Isopropylalkoholdehydrase keine Aerodehydrase ist, brachte neuestens die Arbeit von Lehmann (18); es gelang diesem durch mehrmaliges Waschen und Zentrifugieren des Lebedewsaftes und durch Fällung mit Phosphat-

puffer ein haltbares Fermentpulver, ähnlich dem von Müller, zu gewinnen. In der daraus erhaltenen Fermentlösung zeigt Lehmann, ist Isopropylalkoldehydrase von einer Restreduktion befreit und ziemlich stark, während der Sauerstoffüberträger zerstört ist, da keine Wirkung des Sauerstoffs auf die Fermentlösung feststellbar war.

Auch Lehmann kam dadurch zu dem Schluß, daß die Isopropylalkoholdehydrase keine Aerodehydrase sei.

Ich bin nun am Ende meiner Untersuchungen angelangt. Es ist mir eine angenehme Pflicht Herrn Professor Dr. Hahn für die Überlassung des Themas verbindlichst zu danken. Herrn Dr. Fischbach möchte ich gleichfalls hiermit für die Anleitung zu den Untersuchungen und deren Unterstützung meinen herzlichsten Dank sagen.

Literatur.

1. Abderhalden, Handbuch der Biochem. Arbeitsmethoden. Bd. III. (1910) S. 909.
2. Ahlgreen, Skandin. Archiv Bd. 41, (1921) S. 1.
3. Frey, Über die Atmung einer Fermentlösung aus Hefe, und ihre Deutung durch Dehydrierungsvorgänge. Inaug.- Diss. 1933
4. Frommer v., Berlin klin. Wschr., Bd. 42, (1905) S. 1008.
5. Hahn, Fischbach und Haarmann, Ztschr. f. Biol. 89 (1930) S 568.
6. — Ztschr. f. Biol. 88 (1929), S. 516.
7. — Ztschr. f. Biol. 90 (1930), S. 231.
8. Hahn, Fischbach und Niemer, Ztschr. f. Biol. 93 (1932), H. 2.
9. — Ztschr. f. Biol. 94 (1933), H. 1.
10. Hahn und Fischbach, Zeitschr. f. Biol. 95 (1934), H. 2.
11. Hahn und Dürr, Ztschr. f. Biol. 95 (1934), H. 3.
12. Hahn und Haarmann, Zfschr. f. Biol, Bd. 89, H. 2.
13. Haarmann, Neuere Theorien über den Mechanismus und Verlauf der biologischen Oxydationsvorgänge. Inaug.-Diss. 1927.
14. Huppert-Messinger, Bestimmung des Acetons. Hoppe-Seyler, 1924, S. 740.

15. Le Nobel, Über den Nachweis des Acetons. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. 18, S. 9.
16. Lipmann, Biochem. Ztschr. 196, 1928, S. 3.
17. Lebedew, Darstellg. des aktiven Hefesaftes durch Maceration. Hoppe-Seyler 73 (1911), S. 447.
18. Lehmann, Aktivierung von Hefealkoholdehydrase durch CO-Encym. Biochem. Ztschr. 272 (1934), H. 1.
19. Meyerhof, Die chem. Vorgänge im Muskel und ihre Zusammenhänge mit der Arbeitsleistung und Wärmebildung. Berlin 1930, S. 147.
20. Müller, Biocchem. Ztschr., 262 (1933), S. 239.
21. — Biochem. Ztschr. 268 (1931), S. 257.
22. — Biochem. Ztschr. 268 (1934), S. 152.
23. — Biochem. Ztschr. 262 (1933), S. 237.
24. Quastel und Wheatley, Oxydation of fatty acids in the Liver. Biochem. Journ. Bd. XXVII, S. 1756.
25 Siebeck, Biochem Arbeitsmethoden, Bd. 8, (1934), S. 39.
26. Szent-Györgyi, Biochem. Ztschr., 150, (1924), S. 195.
27. Thunberg, Skandin. Arch. 40, (1920), S. 1.
28. Sammet O., Beitr. zur quantitativen Bestimmung des Acetons. Hoppe-Seyler, Ztschr. f. Phys. Chemie Bd. 83, (1913), S. 212.
29. Warburg, Biochem. Ztschr., 214, 19, 101, 107, (1929).
30. — Biochem. Ztschr, 152, 477, (1924).
31. — Biochem. Ztschr., 134, (1921).
32. Wieland, Ergebn. d. Physiol., Bd. 20, (1922).
33. Wieland und Claren, Liebigs Anualen 492, (1932), S. 183.

Lebenslauf.

Als Sohn des praktischen Arztes Dr. Bruno Dünnwald wurde ich am 1. Juli 1912 in Leimbach bei Mansfeld am Harz geboren, wo ich zuerst die Volksschule Mansfeld und später die Oberrealschule in Eisleben besuchte. In München, seit April 1925, bezog ich die Gisela Oberrealschule, die ich am 10. April 1930 nach bestandenem Abiturientenexamen verließ. Ich widmete mich dem Studium der Zahnheilkunde an der Ludwigs-Maximilians Universität, legte am 8. August 1931 das Vorexamen ab und beendete das Studium am 24. April 1934 mit der Erwerbung der Approbation.